#### 世界知的所有權機關

## **PCT**

### 国家事務局



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

A1

(11) 国際公開番号

W096/17073

(51) 国際特許分類6

C12N 15/87, 5/10, C07K 14/78

(43) 国際公開日

1996年6月6日(06.06.96)

(21) 国際出原書号 (22) 国際出頭日

PCT/JP95/02425

P

1995年11月29日(29.11.95)

(30) 優先権データ

特顧平6/317721

1994年11月29日(29.11.94)

弁理士 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540 大阪府大阪市中央区域見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)

(71) 出順人 (米国を除くすべての指定国について)

實酒造株式会社

(TAKARA SHUZO CO., LTD.)[JP/JP]

〒612 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)

(72) 発明者;および

(75) 発明者/出版人(米国についてのみ)

補野仁一(HASHINO, Kimikaza)[JP/JP]

〒569 大阪府高槻市明野町27-3 Osaka, (JP)

松下秀之(MATSUSHITA, Hidsyaki)[JP/JP]

〒525 滋賀県草津市西欧川2丁目12-1

ハーモバレス草準401号 Shiga, (JP)

加廉都之進(KATO, Ikunoshin)[JP/JP] 〒611 京都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto, (JP) (1) 指定国

(74) 代理人

AL, AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, FE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU. MC, NL, PT, SE), OAPIN PT (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPON IF (KE, LS, MW, SD, SZ, UG).

新付公開書類

国際調査報告

(54) Tide: PROCESS FOR PRODUCING TRANSFORMED CELL

(54) 発明の名称 形質転換細胞の製造方法

(57) Abstract

A process for producing transformed cells by introducing foreign genes into target cells through piercing, which comprises the step of culturing the target cells having the foreign genes injected thereinto in the presence of a cell adhesion-active substance; and a kit for producing transformed cells suitable for use in the above method and containing as the essential ingredients the cells to be transformed with foreign genes by this method and a cell adhesion active substance. adhesion-active substance.

## (57) 要約

穿孔法を用いて外来遺伝子を標的細胞に導入し、形質転換細胞を製造するに際し、標的細胞内に外来遺伝子の注入操作を行った後、該細胞を細胞接着活性物質の存在下で培養する工程を包含する外来遺伝子による形質転換細胞の製造方法、該方法によって製造される外来遺伝子による形質転換細胞および細胞接着活性物質を必須の構成成分とする該方法で使用するに適した形質転換細胞製造用キットを開示する。

## 明細

## 形質転換細胞の製造方法

### 技術分野

本発明は、形質転換細胞の製造方法、さらに詳しくは、細胞工学、遺伝 子工学、発生工学などの分野において標的細胞への外来遺伝子導入を効率 良く行うことを可能にする方法に関する。

### 背景技術

標的細胞内への外来遺伝子導入方法には、リン酸カルシウム法、DEAEーデキストラン法、リボソーム法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法などが知られている。いずれの方法も操作法、効率、細胞に対するダメージなどの点で一長一短がある。中でもエレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等の穿孔法は、特別な試薬を用いることなく細胞の取扱いが可能であり、導入効率も良好である。しかしながら、穿孔による細胞のダメージは免れない。

本発明の目的は、穿孔法により標的細胞内へ外来遺伝子を導入して形質 転換細胞を製造する際の、導入効率を向上させる方法を提供することにあ る。さらに、該方法に用いるキットを提供することも目的とする。

### 発明の概要

本発明の第1の発明は形質転換細胞の製造方法に関する発明であって、 穿孔法を用いて形質転換細胞を製造する方法において、穿孔法を用いて標 的細胞内に外来遺伝子の注入操作を行った後、該細胞を細胞接着活性物質 の存在下で培養する工程を包含することを特徴とする。

本発明の第2の発明は、本発明の製造方法で製造される外来遺伝子による形質転換細胞に関する発明である。

また、本発明の第3の発明は、形質転換細胞製造用キットに関する発明であって、上記第1の発明の形質転換細胞の製造方法に使用するキットであって、細胞接着活性物質を含有することを特徴とする。

### 発明の詳細な説明

本発明の方法は、穿孔法を用いて標的細胞に外来遺伝子を導入した後に、 細胞接着活性を有する物質の存在下この細胞を培養することを特徴とする。

本発明において穿孔法とは、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等であり、細胞壁の穿孔により、遺伝子を注入する方法である。エレクトロポレーション法とは、例えば、蛋白質、核酸、酵素、第31巻、第1591~1603頁(1986)に記載の方法であり、マイクロインジェクション法とは、例えば、セル(Cell)、第22巻、第479~488頁(1980)に記載の方法であり、パーティクルガン法とは、例えば、テクニーク(Technique)、第3巻、第3~16頁(1991)に記載の方法であり、細胞に遺伝子を導入する方法として使用する公知の方法を包含する。

これらの穿孔法で使用される細胞としては、例えば、動物細胞を公知 [日本生化学会編: "新生化学実験講座18 細胞培養技術"、(第1版) (1990)東京化学同人発行]の方法で調製すれば良く、また、培養動 物細胞を使用しても良い。

細胞接着活性物質とは、細胞接着活性、すなわち標的細胞を細胞、あるいは組織内にある細胞間を満たす物質である細胞外マトリックス、またプラスチックやガラスなどの器質に接着させる活性を有する物質をいい、本

発明においては、標的細胞の形質転換に悪影響を及ぼさない限り、いずれの該活性を有する物質も使用できる。かかる活性とは、細胞をその形態を保持して、あるいは伸展、すなわち一またはそれ以上の方向に細胞が伸び、その形態が変化した状態で、例えば細胞接着活性物質を被覆した培養器具に固定する活性である。

細胞接着活性物質と標的細胞の結合は慣用の方法を使用して同様にアッセイすることができる。例えば、このような方法にはネイチャー(Nature)、352:438~441(1991年)に記載された方法が含まれる。簡単に言えば、細胞接着活性物質はプラスチック皿上を被覆しており、そしてアッセイすべき細胞集団は培地に重層して30分から2時間置く。このインキュベーション期間後に、接着していない細胞を回収し、計数しそして生存性についてアッセイする。細胞接着活性物質と接着した細胞もトリプシンまたは細胞解離緩衝液(例えば、Gibco)を使用して回収し、計数しそして生存性を試験する。次に、接着細胞の割合を計算しそしてウシ血清アルブミン(BSA)被覆プラスチック皿のような標準乃至標準対照と比較する。標的細胞とアッセイした細胞接着活性物質の実質的な接着によって、細胞接着活性物質/細胞の組合せを決定できる。または細胞伸展活性は、上記操作中、接着した細胞をトリプシンまたは細胞解離緩衝液を用いて解離させる前にその形態変化を顕微鏡下で観察することによって測定することができる。

細胞接着活性物質としては、例えば、細胞接着活性ポリペプチドまたは 該ポリペプチドの機能的同等物や細胞接着合成ポリマーが挙げられる。

本発明に使用する細胞接着活性を有するポリペプチドとしては、例えば、インベイシン、ポリリジン等の細胞外マトリックス由来以外の細胞接着活性ポリペプチド、例えば、特開平2-311498号公報に記載の細胞伸

展活性を示すポリペプチド、例えば、フィブロネクチン、ラミニン、コラ ーゲン、ビトロネクチン、オステオポンチン、トロンボスポンジン、テネ イシン等の細胞外マトリックスの構成成分等がある。細胞外マトリックス 構成成分は公知の方法 [インターナショナル ジャーナル オブ キャン サー(International Journal of Cancer)、第20巻、第1~5頁(19 77)、ジャーナル オブ パイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)、第254卷、第9933~9937頁(197 9) 、日本生化学会編: "統生化学実験講座 第6巻 細胞骨格の構造と 機能(下)"、(第1版)(1986)東京化学同人発行、セル ストラ クチャー アンド ファンクション (Cell Structure and Function)、第 13巻、第281~292頁(1988)、ジャーナル オブ バイオロ ジカル ケミストリー、第264巻、第18202~18208頁(19 89)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、第260巻、 第12240~12245頁(1985)]で、天然物、培養物より調製 することができる。細胞接着活性ポリペプチドとしては、実質的に純化さ れた細胞接着活性を示す細胞外マトリックス、実質的に純化された細胞外 マトリックスフラグメントまたはそれらの混合物でも良く、細胞接着活性、 細胞伸展活性を有するタンパク質、ポリペプチドおよびその機能的同等物 を使用することができる。

これらの細胞接着活性ポリペプチドは、実質的に純化された天然物を使用しても良く、その酵素学的、化学的分解物、またこれらの物質を遺伝子工学的に作成したものを使用しても良い。さらに、これらの物質の機能、すなわち細胞接着活性、細胞伸展活性を損なうことなく改変した物も使用することができる。なお本発明において、天然起源のポリペプチドのアミノ酸配列のアミノ酸が欠失、置換、付加および/または挿入のいずれかー

つがなされていても所望の細胞接 活性、細胞伸展活性を有するポリペプチドを天然アミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的同等物という。すなわち、天然に存在するタンパク質にはそれをコードする遺伝子の多形や変異によりアミノ酸配列に変化が生じたものの他に、生成後のタンパク質の生体内および精製中の修飾反応などによって、そのアミノ酸配列中にアミノ酸の欠失、挿入、付加、置換等の変異が起こったものも含まれるが、それにも関わらず変異を有しないタンパク質と実質的に同等の生理、生物学的活性を示すものがあることが知られている。このように構造的に差異があっても、その主要な機能を共通にしていると認められるものを機能的に同等の活性を有するポリペプチドと呼ぶ。

人為的にタンパク質のアミノ酸配列に上記のような変異を導入した場合 でも同様であり、この場合はさらに多種多様の変異体を作製することが可 能であるが、変異を有しないものと実質的に同等の生理活性を示す限り、 これらの変異体は機能的に同等の活性を有するポリペプチドと解釈される。

たとえば、大腸菌で発現されたタンパク質のN末端に存在するメチオニン残基は、多くの場合、メチオニンアミノペプチダーゼの作用により除去されるとされているが、タンパク質の種類によってはメチオニン残基を持つもの、持たないものの両方が生成される。しかしながら、このメチオニン残基の有無はタンパク質の活性に影響を与えない場合が多い。また、ヒトインターロイキン2(1L-2)のアミノ酸配列中の、あるシステイン残基をセリンに置換したポリペプチドがインターロイキン2活性を保持することが知られている [サイエンス (Science)、第224巻、1431頁(1984)]。

さらに、遺伝子工学的にタンパク質の生産を行う際には、融合タンパク 質として発現させることがしばしば行われる。たとえば、目的のタンパク 質の発現量を増加させるために、目的のタンパク質のN末端に他のタンパク質由来のN末端ペプチド鎖を付加したり、目的のタンパク質のN末端、あるいはC末端に適当なペプチド鎖を付加して発現させ、この付加したペプチド鎖に親和性を持つ担体を使用することにより、目的のタンパク質の精製を容易にすることなどが行われている。

この点に関して、関連バイオテクノロジー技術は、対象の機能的領域中のアミノ酸の欠失、置換、付加または他の修飾を定型的に実施することができる状態にまで進歩している。次に、得られたアミノ酸配列は所望の細胞接着活性または細胞伸展活性について、上記の方法により定型的にスクリーニングすることができる。

細胞接着活性を有するポリペプチドは、分子内に細胞接着活性に必要なアミノ酸配列、例えば、配列表の配列番号1(RGDS)で表されるアミノ酸配列、配列表の配列番号2(CS1)で表されるアミノ酸配列、配列表の配列番号6(ラミニンの中心配列、YIGSR)で表されるアミノ酸配列より選択されるアミノ酸配列を含有する人工のポリペプチドでも良く、これらのポリペプチドは遺伝子工学的方法、化学合成方法で大量に調製でき、純化されたポリペプチドとして使用することができる。

分子内に配列表の配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有する人工のポリペプチドとしては、例えば、特開平 1-180900 号公報に記載の配列表の配列番号 7 で表されるポリペプチドがあり、該ポリペプチドは、Escherichia coli HB 101/p TF 1409 (FERM BP -1939) を用いて該公報に記載の方法により調製することができる。また、下記表 1 に示す各配列表の配列番号で表されるポリペプチドも、各公報記載の遺伝子工学的方法により調製することができる。

なお、表1中の Escherichia coli HB101/pCHV90が含有す

るプラスミド HB101/pCHV90は、Escherichia coli HB101/pHD101 (FERM BP-2264) および Escherichia coli JM109/pTF7021 (FERM BP-1941) を用い、特別平5-271291号公報記載の方法により調製することができる。

# 丧1

~ -	•		
公開公報	配列表の	生産菌	寄託番号
	配列番号	(Escherichia coli)	
特開平1-206998号	配列番号8	JN109/pTF7021	FERN BP-1941
特開平1-261398号	配列番号9	HB101/pTF1801	FERM P-9948
特開平2-97397号	配列番号3	JN109/pTF7221	FERM BP-1915
特開平2-152990号	配列番号10	JM109/pTFB800	FERM BP-2126
<b>特開平2-311498号</b>	配列番号11	HB101/pCH101	FERM BP-2799
<b>特開平3-59000号</b>	配列番号12	JN109/pCF406	FERM P-10837
<b>特</b> 開平3-232898号	配列番号13	HB101/pCE102	FERM P-11226
特開平4-54199号	配列番号14	JN109/pTF7520	FERM P-11526
•		+VN-IN. TAA	
	配列番号15	JM109/pTF7520	•
		+Col <sup>x1</sup>	FERM P-11527
特開平5-271291号	配列番号16	HB101/pCHV179	FERM P-12183
	配列番号17	HB101/pCHV90	-
	配列番号18	HB101/pCHV89	FERM P-12182
特開平5- 97698号	配列番号19	JM109/pTF7520ColV	FERN BP-5277
特開平5-178897号	配列番号20	JM109/pYMH-CF · /	FERN BP-5278

また、分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する人工のポリペプチドは化学合成することもでき、例えば、特開平3-173828号公報に配載のポリRGDSを合成、使用しても良い。

分子内に配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列を有する人工のポリペプチドとしては、例えば、特開平2-311498号公報に配載の配列表の配列番号4で表されるポリペプチドがあり、該ポリペプチドはEscherichia coli HB101/pHD102 (FERM P-10721)を用いて公報に配載の方法により遺伝子工学的に調製することができる。また、特開平3-284700号公報に配載の方法に従い、配列表の配列番号2で表されるポリペプチドを化学合成しても良い。

さらに、分子内に配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列および配列表の配列番号3で表されるアミノ酸配列を含有する人工のボリペプチドとしては、例えば、特開平2-311498号公報に記載の配列表の配列番号21で表されるボリペプチドがあり、該ボリペプチドは Escherichia coli HB101/pCH102(FERM BP-2800)を用いて公報に記載の方法により遺伝子工学的に調製することができる。また、特開平3-284700号公報に記載の配列表の配列番号5で表されるボリペプチドも分子内に配列表の配列番号1、2のアミノ酸配列を含有するボリペプチドであり、該ボリペプチドは Escherichia coli HB101/pCS25(FERM P-11339)を用いて公報に記載の方法により遺伝子工学的に調製できる。

以上のように、本発明に使用するポリペプチドの例としては、分子内に 配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列および/または配列表の配列 番号2で表されるアミノ酸配列を含有する細胞接着活性ポリペプチドがあ り、該ポリペプチドとしては、例えば、ヒト・フィブロネクチンの細胞接 ドメイン [モッシャー, D. F. (Mosher, D. F.) 編: "フィブロネクチン" (Fibronectin)、第47~121頁(1989)アカデミックプレス (Academic Press)発行]由来ポリペプチドと同CS1ポリペプチド(同上刊行物)が共有結合したもの、CS1ポリペプチドを含有するヘパリン結合ドメイン(同上刊行物)由来ポリペプチド、あるいは細胞接着由来ポリペプチドを使用することができ、これらはそれぞれ遺伝子工学的に作製することができる。例えば、細胞接着ドメイン由来ポリペプチドをコードするDNAを含むベクター、CS1ポリペプチドをコードするDNAを含むベクター、CS1ポリペプチドをコードするDNAを含むベクターから、それぞれ必要な領域を取出し、単独あるいは組合せて使用することにより、分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列および/または配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。

分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドと分子内に配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドが共有結合したポリペプチドを作製する場合、ポリペプチド間の共有結合は、直接結合であってもよく、間接結合、例えば、スペーサーを介した間接結合であってもよい。スペーサーは、各領域の分子間距離を調節するための挿入配列であり、任意のペプチド鎖を用いることができ、例えば、フィブロネクチン分子中のCS1領域の上流配列であってもよい。スペーサー配列は遺伝子工学的に容易に導入することができる。

細胞接着合成ポリマーとしては、例えば、公知のポリーN-p-ビニルベンジル-D-ラクトンアミド (PVLA) が挙げられる。

本発明において、標的細胞は特に限定するものではないが、例えば、造

血幹細胞、末梢血幹細胞、臍帯血細胞、ES細胞、リンパ球、癌細胞等が 挙げられる。

外来遺伝子も、特に限定するものではなく、例えば、タンパク質をコードする核酸、ポリペプチドをコードする核酸、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、細胞内抗体をコードする核酸、偽(デコイ)遺伝子から選択される核酸が挙げられ、本発明においては、外来遺伝子はベクターに組み込まれていてもよい。

ベクターとしては、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルス ベクター、ワクシニアウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター等が 挙げられる。

本発明によれば、常法に従って穿孔法によって外来遺伝子を導入した標的細胞を、細胞接着活性物質の存在下で培養することにより、該遺伝子が導入された形質転換細胞を効率よく得ることができる。細胞培養方法としては使用する細胞により、公知の方法から選択すれば良い。例えば細胞接着活性ポリペプチドの存在下で細胞培養を行う場合、培養液中に250~2000μg/mlの細胞接着活性ポリペプチドを含有させ、常法に従い培養すれば良い。

特に、細胞接着活性物質を被覆した培養器具を用いて培養するのが好ましい。培養器具とは、通常に細胞を培養する目的に使用する器具であれば良く、例えば、培養皿、マイクロキャリアー使用の培養器具、繊維状の中空糸使用の培養器具である。培養器具への該物質の被覆方法としては墜布しても良く、散布しても良い。例えば、細胞接着活性ポリペプチドの培養器具への被覆は容易に行うことができ、該ポリペプチドを例えばリン酸緩衛生理食塩水(PBS)のような適当な溶液に溶かし、培養器具に添加し、適当時間静置することで培養器具にポリペプチドを被覆できる。培養器具

に被覆するポリペプチド量としては $50\sim1000$  pmol/cm<sup>2</sup>の範囲、好適には $150\sim600$  pmolの範囲より選択すれば良い。

細胞接着活性物質の存在下で培養した形質転換細胞は培養物中より常法により得ることができ、形質転換細胞を効率よく製造することができる。

得られた形質転換細胞は、細胞の遺伝子組換え技術を用いる有用物質の 生産、疾患モデルの開発、遺伝子治療等に有用であり、本発明により、効 率よく形質転換細胞が提供される。

また、細胞接着活性物質を含有するキットを使用することにより、本発明を簡便に行うことができる。キット中に含有される細胞接着活性物質は溶液でも良く、凍結乾燥品でも良い。キット中には細胞接着活性物質の溶解、希釈用緩衝液、細胞培養培地、細胞培養器具等を含有させても良い。例えば本発明の方法に用いるポリペプチド類、ポリペプチド希釈用PBS、培養器具等をまとめてキットとしておくことにより、簡便に、形質転換細胞の製造を行うことができる。キットに含める試薬は、溶液状でも凍結乾燥物でもよい。

なお、本発明で使用する穿孔法としての、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等は、目的に応じて適 宜選択、使用できる。

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれ ら実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1

1. 細胞接着活性ポリペプチドの培養皿への塗布

配列表の配列番号3.で表されるポリペプチド(以下C274と称す)、 配列表の配列番号4で表されるポリペプチド(以下H296と称す)およ び配列表の配列番号5で表されるポリペプチド(以下C・CS1と称す) をそれぞれ $1 \mu M$ となるようにリン酸級衝生理食塩水 (PBS) に溶かし、 $0.22 \mu m$ のフィルター (マイレクスーGV、ミリポア社) を用いて滅菌した。

これらの溶液をそれぞれ24穴のポリスチレン製培養皿(コーニング社製)に1m1/ウエルとなるように添加し、4 $^{\circ}$ 、一晩コートした。この培養皿は、以下に配載の形質転換細胞を添加する前に、ウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地 $500\mu1$ /ウエルでリンスした。

## 2. 細胞の形質転換

10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地で培養したヒト 類表皮癌A-431細胞の培養皿(直径100mm)2枚分をそれぞれ1 0mlのウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地でリンスし た後、0.25%ウシ・トリプシンと0.02%EDTAを含むPBSを 3m1添加して細胞を培養皿よりはがした。これらに、それぞれ7mlの ウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地を加えた後、800 rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を10mlのウシ胎児 血清を含むダルベッコ改変最少基本培地に懸濁し800mpm、3分遠心 して細胞を集めた。得られた細胞を合せて、10mlのPBSに懸濁し、 その10分の3量を取り、二分した後、それぞれを800rpm、3分違 心して細胞を集めた。得られた細胞を再度、10mlのPBSに懸濁し、 800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞の一方は、無菌 的に調製されたpCAT-コントロール (control)ベクター (プロメガ社) 15μgを含む1mlのPBSに懸濁した後、ジーンパルサー(バイオラッ ド社) 用のエレクトロポレーションキュベットに入れ、氷中で10分放置 した。もう一方の細胞は、1mlのPBSに懸濁した後、ジーンパルサー (バイオラッド社) 用のエレクトロポレーションキュベットに入れ、氷中

で10分放置した。それぞれの細胞は、氷中10分放置後、250V、960 μFで電圧を印加した。印加後、細胞をキュベットのまま氷中で10分放置した。この後、15mlの10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地中へ細胞を回収し、上記のポリペプチドをコートした24穴のポリスチレン製培養皿に1ml/ウエルとなるように添加した。これらの細胞を5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した後、培地をアスピレーションで除去し、新たに10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地を1ml/ウエルとなるように加え、5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した。

# 3. 形質転換効率 (遺伝子導入効率) の測定

培養した細胞は、1ウエル当り1.25mlのPBSで3回リンスし、CAT-ELISAキット(ベーリンガー・マンハイム社製)を用い、本キットの使用方法に従い、細胞溶解液を調製し発現CATの検出を行った。本キットは、西洋ワサビのベルオキシダーゼ標識の2次抗体と基質としてABTSを用いているので405nm/490nmを測定し、エレクトロポレーションの際、pCAT-コントロールベクターを添加しなかったものをブランクとして用い、各区のpCAT-コントロールベクターを添加したものの値からブランク値を引いた値を発現CAT量とした。

この結果を図1に示す。すなわち、図1は各ポリペプチド処理区での細胞への遺伝子導入効率を示す図であり、縦軸に無処理区、各ポリペプチド処理区が示され、横軸は405nmの吸光度と490nmの吸光度比で遺伝子導入効率が示されている。

図1に示すように、上記C274、H296、C・CS1処理区では無処理の培養皿に比べて発現CAT量は高く、pCAT-コントロールベクターの細胞への導入効率が高いことが示された。

### 実施例2

## 1. 細胞接 活性ポリペプチドの培養皿への塗布

配列表の配列番号3で表されるポリペプチド(以下C274と称す)、 配列表の配列番号4で表されるポリペプチド(以下H296と称す)および配列表の配列番号5で表されるポリペプチド(以下 $C \cdot CS1$ と称す) をそれぞれ $1\mu M$ となるようにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶かし、 $0.22\mu m$ のフィルター(マイレクスーGV、ミリポア社)を用いて滅菌した。これらの溶液をそれぞれ24穴のポリスチレン製培養皿(コーニング社製)に1m1/ウエルとなるように添加し、4 $^{\circ}$  、一晩コートした。この培養皿は、以下に配載の形質転換細胞を添加する前に、ウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地 $500\mu1$ /ウエルでリンスした。

#### 2. 細胞の形質転換

10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地で培養したアフリカミドリザル腎COS-7細胞の培養皿(直径100mm)2枚分をそれぞれ10mlのウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地でリンスした後、0.25%ウシ・トリプシンと0.02%EDTAを含むPBSを3ml添加して細胞を培養皿よりはがした。これらに、それぞれ7mlのウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地を加えた後、800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を10mlのウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地に懸濁し800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を合せて、12mlのPBSに懸濁し、その6分の5量を取り、二分した後、それぞれを800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を、6mlのPBSに懸濁し、その6分の5量を取り、二分した後、それぞれを800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を、6mlのPBSに懸濁し、800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞の一方は、無菌的に調製されたpCAT-コントロール(control)ベクター(プロメガ社)

15μgを含む1m1のPBSに懸闇した後、ジーンパルサー(パイオラッド社)用のエレクトロポレーションキュペットに入れ、氷中で10分放置した。もう一方の細胞は、1m1のPBSに懸濁した後、ジーンパルサー(パイオラッド社)用のエレクトロポレーションキュペットに入れ、氷中で10分放置した。それぞれの細胞は、氷中10分放置後、250V、960μFで電圧を印加した。印加後、細胞をキュペットのまま氷中で10分放置した。この後、15m1の10%ウシ胎児血清を含むダルペッコ改変最少基本培地中へ細胞を回収し、上記のポリペプチドをコートした24穴のポリスチレン製培養皿に1m1/ウエルとなるように添加した。これらの細胞を5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した後、培地をアスピレーションで除去し、新たに10%ウシ胎児血清を含むダルペッコ改変最少基本培地を1m1/ウエルとなるように加え、5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した。

### 3. 形質転換効率 (遺伝子導入効率) の測定

培養した細胞は、1ウエル当り1.25m1のPBSで3回リンスし、
CAT-ELISAキット(ペーリンガー・マンハイム社製)を用い、本キットの使用方法に従い、細胞溶解液を調製し発現CATの検出を行った。本キットは、西洋ワサビのペルオキシダーゼ標識の2次抗体と基質としてABTSを用いているので405mm/490mmを測定し、エレクトロポレーションの際、PCAT-コントロールベクターを添加しなかったものをブランクとして用い、各区のPCAT-コントロールベクターを添加したものの値からブランク値を引いた値を発現CAT量とした。この結果を図2に示す。すなわち、図2は各ポリペプチド処理区での細胞への遺伝子導入効率を示す図であり、縦軸に無処理区、各ポリペプチド処理区が示され、横軸は405mmの吸光度と490mmの吸光度比で遺伝子導入効

率が示されている。

図2に示すように、上記C274、H296、C・CS1処理区では無処理の培養皿に比べて発現CAT量は高く、pCATーコントロールベクターの細胞への導入効率が高いことが示された。

#### 実施例3

キットの作製

下記表2に示すようにC274、H296、C・CS1、PBSおよび 培養皿で遺伝子導入細胞製造用キットを作製した。このうち、試薬A、B、Cはそれぞれ上記のポリペプチドをPBSにて表に示す濃度としたものを 調製した。その他は、実施例1に記載のものを使用した。なお、表2に示すキットの試薬A、B、Cおよび試薬希釈液は、いずれも0.22μmの 被菌フィルターで予めろ過したものを用いて、無菌的に調製した。

表 2

## 形質転換細胞製造用キット

試薬A・・・100μM	C 2 7 4	150μ1
試薬B・・・100μM	H 2 9 6	150μ1
試薬C・・・100μM	C·CS1	150 μ Ι
試薬希釈液・・・PBS		4 5 m l
9.4 会計リスチレン制停率	£ m	3.₩

以上記載したごとく、本発明によれば、細胞への遺伝子導入を目的とする従来法の問題点を解決し、標的細胞への外来遺伝子導入効率を向上させた形質転換細胞製造方法が提供できる。また、該方法に使用する形質転換細胞製造用のキットも提供することができる。

# 図面の簡単な説明

図1は、ヒト類表皮癌A-431細胞へのpCAT-コントロールベクターの導入における細胞接着活性ポリペプチド処理の遺伝子導入効率に対する効果を示すグラフである。

図2は、アフリカミドリザル腎COS-7細胞へのpCAT-コントロールベクターの導入における細胞接着活性ポリペプチド処理の遺伝子 入効率に対する効果を示すグラフである。

配列 号:1

配列の長さ:4

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Arg Gly Asp Ser

1

配列番号:2

配列の長さ:25

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His

5

10 15

Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr

20 25

配列番号:3

配列の長さ:274

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー: 直鎖状 配列の種類: ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lie Gly Pro Asp Thr Met Arg 1 5 10 15 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu 20 25 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu 35 40 Ser lie Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu 55 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp 80 Ser Pro Thr Gly He Asp Phe Ser Asp He Thr Ala Asn Ser Phe 95 100 105 Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tym Arg 120 110 115 Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp 125 130 Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr 140 145 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser lie Val Ala Leu Asn Gly Arg 160 165

Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	He	Gly	Gin	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	YZb
			170					175					180
Pro	Årg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
			185					190					195
lle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	λrg	Tyr	Tyr	λrg
		•	200					205					210
Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Giv	Phe
			215					220					225
· Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
-			230		•			235					240
Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
			245					250				•	255
y Ast	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	ile	Ser	ile	Asn	Tyr	Arg
			260					265					270
	Pro Ile Thr	Pro Arg  lie Ser  Thr Tyr  Val Pro	Pro Arg Asp  lie Ser Trp  Thr Tyr Gly  Val Pro Gly  Gly Val Asp	Pro Arg Asp Leu 185 lie Ser Trp Asp 200 Thr Tyr Gly Glu 215 Val Pro Gly Ser 230 Gly Val Asp Tyr 245 y Asp Ser Pro Ala	Pro Arg Asp Leu Glu 185 lie Ser Trp Asp Ala 200 Thr Tyr Gly Glu Thr 215 Val Pro Gly Ser Lys 230 Gly Val Asp Tyr Thr 245	170 Pro Arg Asp Leu Glu Val 185 Ile Ser Trp Asp Ala Pro 200 Thr Tyr Gly Glu Thr Gly 215 Val Pro Gly Ser Lys Ser 230 Gly Val Asp Tyr Thr Ile 245 y Asp Ser Pro Ala Ser Ser	Pro Arg Asp Leu Glu Val Val  185  Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala 200  Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly 215  Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr 230  Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr 245  y Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys	Pro Arg Asp Leu Giu Vai Vai Ala 185  Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Vai 200  Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn 215  Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala 230  Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Vai 245  y Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro	170 175  Pro Arg Asp Leu Giu Vai Vai Ala Ala 185 190  Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Vai Thr 200 205  Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser 215 220  Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr 230 235  Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Vai Tyr 245 250  y Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile	170 175  Pro Arg Asp Leu Giu Val Val Ala Ala Thr 185 190  Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val 200 205  Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro 215 220  Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile 230 235  Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala 245 250  y Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser	Pro Arg Asp Leu Giu Val Val Ala Ala Thr Pro 185 190  Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg 200 205  Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val 215 220  Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser 230 235  Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val 245 250  y Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile	Pro Arg Asp Leu Giu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr 185  Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr 200  Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln 215  Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly 230  Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr 245  V Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn	Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser  185  190  Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr 200  205  Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu 215  220  Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu 230  235  Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly 245  250  y Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr

配列の長さ:296 ・

配列の型:アミノ酸

Thr Glu lle Asp

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Ala lle Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gin Val Thr Pro

10

Thr	Ser	Leu	Ser	Ala	Gin	Trp	Thr	Pro	Pro	Asn	Val	Gin	Leu	Thr
				20					25					30
Gly	Tyr	Arg	Va l	Arg	Val	Thr	Pro	Lys	Glu	Lys	Thr	Gly	Pro	Met
				35					40					45
Lys	Glu	lle	Asn	Leu	Ala	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Val	Val	Ser
				50					55					60
Gly	Leu	Met	Val	Ala	Thr	Lys	Tyr	Glu	Val	Ser	Val	Tyr	Ala	Leu
				65					70	•				75
Lys	Asp	Thr	Leu	Thr	Ser	λrg	Pro	λla	Gln	Gly	Val	Val	Thr	Thr
				80					85					90
Leu	Glu	Asn	Val	Ser	Pro	Pro	Árg	Årg	Ala	Arg	Val	Thr	Asp	Ala
				95					100					105
Thr	Glu	Thr	Thr	ile	Thr	lle	Ser	Trp	Arg	Thr	Lys	Thr	Glu	Thr
				110					115					120
l l e	The	Gly	Phe	Gin	Val	λsp	Ala	Val	Pro	λla	Asn	Gly	Gin	Thr
				125					130					135
Pro	H	e Gli	n Arg	Thr	lle	Lys	Pro	Asp	Val	Arg	Ser	Tyr	Thr	lle
		٠		140	)				145	i	,			150
The	r Gl	y Le	n Cju	Pro	Gly	Thr	Asp	Tyr	Lys	lle	Tyr	Leu	Tyr	Thr
				155	j			٠	160	)				165
Le	u As	n As	p Ası	n Ala	Arg	Sei	r Sei	Pro	Val	Val	He	Asp	Ala	Ser
				170	)				175	5				180
Th	rλl	a II	e As	p Ala	e Pro	Sei	r Ası	n Lei	ı Arg	? Phe	Lei	ı Ala	The	Thr
				18	5				190	)				195

Pro	ASN	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Trp	Gin	Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	lle
				200					205					210
Thr	Gly	Tyr	lle	lle	Lys	Tyr	Glu	Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg
				215					220					225
Glu	<b>Val</b>	Val	Pro	Arg	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Thr	Glu	Ala	Thr	1·1 e
				230			•		235					240
Thr	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Thr	llε	Tyr	Val	He	Ala
				245					250					255
Leu	Lys	Asn	Asn	Gin	Lys	Ser	Glu	Pro	Leu	ile	Gly	Arg	Lys	Lys
				260					265					270
Thr	Asp	Clu	Leu	Pro	Gin	Leu	Val	Thr	Leu	Pro	His	Pro	Asn	Leu
		•		275					280					285
His	Gly	Pro	Glu	lle	Leu	Asp	Val	Pro	Ser	Thr				
				290					295					

配列の長さ:302

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

al	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	lle	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
			•	20					25					30
/al	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	C l u	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35			,		40					45
Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Åsp	Àsn	Ala	Val	Va İ-	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Vai	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Vai	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	C I n	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	ile	Thr	Ala	Asn	Ser	•
				95					100					105
Thr	Va!	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	
				110					115					120
lle	Arg	His	His			His	Phe	Ser			Pro	Arg	Glu	
				125					130					135
Arg	Val	l Pro	His			Asn	Ser	ile			Thr	Asn	Leu	
	•			140					145					150
Pro	Gly	/ Thi	Glu			Val	Ser	ile			Leu	ı Asn	Gly	
				155				•	160				_	165
Glu	Gli	u Se	r Pro			lle	Gly	, Gln			Thr	· Val	Ser	
				170					175				_	180
۷a	l Pr	o Ar	g Ass			ı Val	l Val	Ala			r Pro	Thi	r Ser	
				189	Ď				190	)				19:

Leu	lle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	λla	Val	Thr	۱s۷	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205					210
lle	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Va I	Gln	Ģlu	Phe
				215					220					225
Thr	V a l	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	G i y	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lie	Thr	Va l	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
Giy	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	lle	Asn	Tyr	Arg
				260					265			. •		270
Thr	Ğlu	lle	Asp	Lys	Pro	Ser	Asp	Glu	Leu	Pro	Gin	Leu	Val	Thr
				275					280					285
Leu	Pro	His	Pro	Asn	Leu	His	Gly	Pro	Glu	He	Leu	Asp	Val	Pro
•				290					295					300
Ser	Thr													

配列备号:6

配列の長さ:5

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

1

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Tyr lle Gly Ser Arg

配列の長さ:283

配列の型:アミノ酸

鎖の数: | 本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Ala Val Pro Pro Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro 5 10 Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu 25 Thr Asn Phe Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu 50 55 Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser 65 70 Val Tyr Glu Gin His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gin Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp lie Thr 100 Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile 110 115 Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg 125 130 135

Pro	Arg	Glu	Asp	Arg	Val	Pro	His	Ser	Årg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu
				140					145					150
Thr	Asn	Leu	Thr	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	lle	Va i	Ala
				155					160					165
Leu	Asn	Gly	Arg	Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gln	Gln	Ser
				170					175					180
Thr	Val	Ser	Asp	Val	Pro	Arg	λsp	Leu	Glu	Val	Val	λla	Ala	Thr
				185					190					195
Pro	Thr	Ser	Leu	Leu	i l e	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Vai	Thr	Va I
				200					205					210
Arg	Tyr	Tyr	Arg	lle	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro
				215					220					225
Val	Gin	Glu	Phe	Thr	Va !	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	He
				230					235					240
Ser	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala
				245					250					255
Val	Thr	Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	l l'e	Ser
				260					265					270
lle	Asn	Tyr	Arg	Thr	Glu	ile	Asp	Lys	Pro	Ser	Gln	Met		
				275					280					

配列の長さ:279

配列の型:アミノ酸

鎖の数: | 本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg 5 10 ı Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu 20 25 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser lie Ser Pro Ser Asp Asn Aia Val Val Leu Thr Asn Leu Leu 50 55 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro-Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp 80 85 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe 95 100 105 Thr Val His Trp lie Ala Pro Arg Ala Thr lie Thr Gly Tyr Arg 110 115 The Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr 140 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser lie Val Ala Leu Asn Gly Arg 155 160 165

Glu Glu Se	r Pro Leu	Leu lle	Gly Gln	Gln Ser	Thr Val	Ser Asp
	170			175		180
Val Pro Ar	g Asp Leu	Glu Val	Val Ala	Ala Thr	Pro Thr	Ser Leu
	185			190		195
Leu Ile Se	er Trp Asp	Ala Pro	Ala Val	Thr Val	Arg Tyr	Tyr Arg
	200			205		210
lle Thr Ty	r Gly Glu	Thr Gly	Gly Asn	Ser Pro	Val Gln	Glu Phe
	215			220		225
Thr Val Po	ro Gly Ser	Lys Ser	Thr Ala	Thr ite	Ser Gly	Leu Lys
	230			235		240
Pro Gly Va	al Asp Tyr	Thr Ile	Thr Val	Tyr Ala	Val Thr	Gly Arg
	245			250	•	255
Gly Asp Se	er Pro Ala	Ser Ser	Lys Pro	lle Ser	lle Asn	Tyr Arg
	260			265		270
Thr Glu I	le Asp Lys	Pro Ser	Gin Wet			
	275		-			

配列の長さ:474

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

\ I a	Val	Pro	Pro	Pro	Thr	YZD	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	lle	Gly	Pro
1				5					10					15
Asp	Thr	Met	Arg	Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	lle	Asp	Leu
				20					25					30
Thr	Asn	Phe	Leu	Val	Årg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp
				35					40					45
Val	Ala	Glu	Leu	Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu
				50					55					60
Thr	Asn	Leu	Leu	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser
				65					70					75
Val	Tyr	Glu	Gln	His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys
				80					85					90
Thr	Gly	Leu	Asp	Ser	Pro	Thr	·Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr
				95					100	·				105
λla	Asn	Ser	Phe	Thr	Val	Kis	Trp	lle	λla	Pro	Arg	λla	Thr	He
				110			•		115	<b>.</b>				120
Thr	Gly	Tyr	Arg	ile	λrg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg
				125					130	)				135
Pro	λrg	Glo	ı : Asp	Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Lei
				140	)				145	5				150
Thr	Ası	ı Lei	. Thr	Pro	Gly	Thi	Gli	ı Tyr	Val	Val	Ser	lle	Val	Ala
			•	155	j				160	)				165
Lei	ı Ası	n Gly	y Arg	Glu	Glu	ı Şei	Pro	o Leu	Let	: []e	e Gly	Gin	Glo	Se
				170	)				175	5				180

Thr	Val	Ser	YZb	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	<b>Val</b>	Val	Ala	Ala	Thr
				185					190					195
Pro	Thr	Ser	Leu	Leu	lle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Va I
				200					205					210
Arg	Tyr	Tyr	Arg	lle	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro
				215					220					225
Val	Gln	Glu	Phe	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle
				230					235					240
Ser	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala
				245					250				•	255
Val	Thr	Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser
				260					265					270
lle	Asn	Tyr	Arg	Thr	Glu	lle	ASP	Lys	Pro	Ser	Gln	Asn	Glu	Gly
				275					280					285
Leu	Asn	Gin	Pro	Thr	Asp	Asp	Ser	Cys	Phe	Asp	Pro	Tyr	Thr	Vai
				290					295					300
Ser	His	Туг	Ala	Va!	Gly	, yzb	Glu	Trp	Glu	λrg	Met	Ser	Glu	Ser
				305	•				310					315
GLY	Phe	e Lys	Lev	Leu	Cys	Glr	Cys	Leu	Gly	Phe	Gly	Ser	G l·y	His
				320	)				325					330
Phe	e Ars	g Cy:	s ysi	) Ser	. Sei	Arg	Trp	Cys	His	qzk	λsn	Gly	Val	Asn
				335					340					345
Тy	r ly:	s II	e G1	y Glu		Tr	ask o	Arg	Gln	Gly	Glu	Asn	Gly	
				350	)				355					360

Met	Met	Ser	Cys	Thr	Cys	Leu	Gly	Asn	Gly	Lys	Gly	Glu	Phe	Lys
				365					370					375
Cys	Asp	Pro	His	Glu	Ala	Thr	Cys	Tyr	Asp	Asp	Giy	Lys	Thr	Tyr
				380					385					390
His	Val	Gly	Glu	Gln	Trp	Gin	Lys	Glu	Tyr	Leu	Gły	Ala	He	Cys
				395					400			-		405
Ser	Cys	Thr	Cys	Phe	Gly	Gly	Gln	Arg	Gly	Trp	Arg	Cys	Asp	Asn
				410					415					420
Cys	Arg	Arg	Pro	Gly	Gly	Glu	Pro	Ser	Pro	Glu	Gly	Thr	Thr	Gly
				425					430					435
Gln	Ser	Tyr	Asn	Gln	Tyr	Ser	Gln	Arg	Tyr	His	Gln	Arg	Thr	Asn
			•	440					445				•	450
Thr	Asn	<b>Val</b>	Asn	Cys	Pro	lle	Glu	Cys	Phe	Мet	Pro	Leu	ÁSP	Va I
				455					460					465
Gln	Ala	Asp	Arg	Glu	Asp	Ser	Arg	Glu						
				470	)									

配列の長さ:385

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Ala	Pro	He	Val	Asn	Lys	Va I	Val	Thr	Pro	Leu	Ser	Pro	Pro	Thr
1				5					10					15
Asn	Ļeu	His	Leu	Glu	λla	Asn	Pro	Asp	Thr	Gly	۷al	Leu	Thr	۷a ا
				20					25					30
Ser	Trp	Glu	λrg	Ser	Thr	Thr	Pro	Asp	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg	Ιlε
				35					40					45
Thr	Thr	Thr	Pro	Thr	Asn	Gly	Gin	Gln	Gly	Asn	Ser	Leu	Glu	Glu
				50					55					60
Val	Vai	His	Ala	Asp	Gln	Ser	Ser	Cys	Thr	Phe	Asp	Asn	Leu	Ser
				65					70					75
Pro	Gly	Leu	Glu	Tyr	Asn	Val	Ser	Val	Tyr	Thr	Val	Lys	Asp	Asp
				80					85					90
Lys	Glu	Ser	Val	Pro	lle	Ser	Asp	Thr	He	lle	Pro	Ala	Va I	Pro
				95				•	100					105
Pro	Pro	Thr	ÅSP	Leu	Årg	Phe	Thr	Asn	lle	Gly	Pro	Asp	Thr	Met
				110					115					120
Arg	Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	lle	Asp	Leu	Thr	λsn	Phe
	2			125					130					135
Leu	Val	Arg	Туг	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	۷al	Ala	Glu
				140					145					150
Leu	Ser	ile	Ser	Pro	Ser	Asp	λsn	Ala	Val	۷al	Leu	Thr	Asn	Leu
				155				٠	160					165
Leu	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	V a I	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Gli
				170					175					180

Gln	His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gin	Lys	Thr	Gly	Le
				185					190					195
Asp	Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Se
				200					205					210
Phe	Thr	Val	His	Trp	He	Ala	Pro	Årg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Ty
				215					220					225
Årg	lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	λrg	Glu
				230					235					240
Asp	Arg.	Val	Pro	His	Ser	λrg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Lei
				245			•		250					255
Thr	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	lle	Val	Ala	Leu	Asn	Gly
				260					265					270
Arg	Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gin	Gln	Ser	Thr	Val	Sei
				275					280					285
Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Va I	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser
				290					295					300
Leu	Leu	lle	Ser	îrp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Туп
				305					310					315
Arg	ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Cly	Asn	Ser	Pro	Val	Gla	Glu
				320					325			,		330
Phe	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu
				335					340					345
Lys	Pro	Gly	Vai	Asp	Tyr	Thr	He	Thr	Val	.Tyr	Ala	Val	Thr	Gly
				350			,		355					360

Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro 11e Ser 11e Asn Tyr
365 370 375

Arg Thr Glu lie Asp Lys Pro Ser Gln Met
380 385

配列番号:11

配列の長さ:549

配列の型:アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg 1 5 15 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu 20 25 30 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu 35 Ser lle Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu 55 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gin 65 75 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp 80 85 90

WO 96/17073 PCT/JP95/02425

Ser	Pro	Thr	Gly	He	Asp	Phe	Ser	Asp	He	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	He	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	He	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115				•	120
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Årg	Glu	Asp
				125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	He	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Giu	Tyr	Yal	Val	Ser	ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
				170					175					180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190					195
Leu	lle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Årg	Tyr	Tyr	Arg
				200	,				205					210
lle	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gin	Glu	Phe
				215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	λla	Thr	He	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Val	Asp	Туг	Thr	He	Thr	Vai	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Prò	ile	Ser	lle	Asn	Tyr	Arg
				260					265					270

Thr	Glu	He	Y2b	Lys	Pro	Ser	Met	Ala	He	Pro	Ala	Pro	Thr	γzb
				275					280					285
Leu	Lys	Phe	Thr	Gin	Val	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu	Ser	Ala	Gin	Trp
				290					295					300
Thr	Pro	Pro	Asn	Val	Gin	Leu	Thr	Gly	Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Thr
				305					310					315
Pro	Lys	Glu	Lys	Thr	Gly	Pro	Met	Lys	Glu	lle	Asn	Leu	Ala	Pro
				320					325					330
Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Val	Val	Ser	Gly	Leu	Met	Val	Ala	Thr	Lys
				335					340			•		345
Tyr	Glu	Ya I	Ser	Val	Tyr	Ala	Leu	Lys	Asp	Thr	Leu	Thr	Ser	Ar,g
				350					355					360
Pro	Ala	Gln	Gly	Val	Val	Thr	Thr	Leu	Glu	Asn	Val	Ser	Pro	Pro
	•	,		365					370					375
Arg	Arg	Ala	Arg	Val	Thr	Asp	Ala	Thr	Glu	Thr	Thr	ile	Thr	He
				380		,			385					390
Ser	Trp	Arg	Thr	Lys	Thr	Glu	Ţħr	lle	Thr	Gly	Phe	Cln	Va-l	Asp
				395					400					405
Ala	Val	Pro	Ala	Asn	Gly	Cln	Thr	Pro	ile	Gln	Arg	Thr	llë	Lys
				410	ľ				415					420
Pro	Asp	Val	l Arg	Ser	Tyr	The	[16	Thr	Gly	Leu	Gln	Pro	Cly	Thr
				425					430	l				435
Asp	Туг	· Ly:	s IIe	. Tyr	Leu	Туг	r Thi	leu	Ašn	Asp	Asn	Ala	Arg	Ser
				440	)				445	,				450

351	110	101	101	116	nap	nte	561		A14	116	Vah	VID	110	JEI
				455					460					465
Asn	Ľeu	Arg	Phe	Leu	Ala	Thr	Thr	Pro	λsn	Ser	Leu	Leu	۷al	Ser
				470					475					480
Trp	Gln	Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	lle	Thr	Gly	Tyr	He	lle	Lys	Tyr
				485					490					495
Glu	Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Glu	Val	Val	Pro	Arg	Pro	Arg
				500					505					510
Pro	Gly	Val	Thr	Glu	Ala	Thr	ile	Thr	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Thr
				515					520					525
Glu	Tyr	Thr	lle	Tyr	Val	lle	Ala	Leu	Lys	Asn	Asn	Gln	Lys	Ser
				530					535					540
Glu	Pro	Leu	lle	Gly	λrg	lys	Lys	Thr						
				545										

配列番号:12

配列の長さ:422

配列の型:アミノ酸

頭の数: 1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn He Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	lle	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	λsp	Val	λla	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	λsn	λla	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Vai	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gin
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gla	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	ile	Asp	Phe	Ser	Asp	He	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
	,			95					100					105
Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Årg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Årg
				110					115					120
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	λsn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	lle	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	leu	lle	Gly	Gln	Gin	Ser	Thr	Val	Ser	λsp
•				170	}	•			175	ı				180
۷a۱	Pro	Arg	a Asp	Leu	Clu	Val	Val	Ala	λla	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185	,				190	)				195

Leu	lle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	<b>Val</b>	Thr	<b>Vai</b>	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205					210
He	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Va I	Gin	Glu	Phe
				215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Cly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	ile	Asn	Tyr	Arg
				260					265					270
Thr	Glu	lle	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Ala	Asn	Glu	Gly	Leu	Asn	Gln
				275					280					285
Pro	Thr	Asp	Asp	Ser	Cys	Phe	Asp	Pro	Tyr	Thr	Val	Ser	His	Tyr
				290					295					300
Ala	Val	Gly	λsp	Glu	Trp	Glu	Arg	Met	Ser	Glu	Ser	Gly	Phe	Lys
				305	<b>.</b>				310					315
Leu	Leu	Cys	Gla	Cys	Leu	Gly	Phe	Gly	Ser	Gly	His	Phe	Arg	Cys
				320	)				325					330
λsç	Sei	r Se	r Arg	Tr	Cys	His	. Asp	Asn	Giy	Val	Asn	Tyr	Lys	lle
				335	5				340	ı				345
Gly	/ Gli	u Ly:	s Tri	a Asi	Ār	Glo	Gly	/ Glu	Asn	Gly	Glo	Met	Mei	Ser
				350					355	i.		•		360
Cy:	s Th	r Cy	s Lei	u Gly	y Asi	n Gly	y Ly:	s Gly	Glu	Phs	Lys	Cy:	s Asp	Pro
				36	5				370	)				375

His Glu Ala Thr Cys Tyr Asp Asp Gly Lys Thr Tyr His Val Gly

380 385 390

Glu Gln Trp Gln Lys Glu Tyr Leu Gly Ala Ile Cys Ser Cys Thr

395 400 405

Cys Phe Gly Gly Gln Arg Gly Trp Arg Cys Asp Asn Cys Arg Arg

410 415 420

配列番号:13

配列の長さ:332

配列の型:アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

 Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn I le Gly Pro Asp Thr Met Arg

 1
 5
 10
 15

 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Pro Ser I le Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20
 25
 30

 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35
 40
 45

 Ser I le Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50
 55
 60

 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
 65
 70
 75

lis	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Cla	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
ile	Arg	His	His	Pro	Glu	Ĥis	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Årg	Glu	Asp
				125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155		•			160					165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
				170					175					180
Val	Pro	λrg	Asp	Leu	Głu	Val	۷al	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
٠.				185					190					195
Leu	lle	Ser	Trp	λsp	λla	Pro	slk	· Val	Thr	Val	4rg	Tyr	Tyr	Arg
		•		200					205					210
He	Thr	Туг	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	۷al	Gln	Glu	Phe
				215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	lsV	Asp		Thr	lle	Thr	Val	Tyr	λla	Va I	Thr	Cly	Arg
				245					250					255

Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg 260 265 270 Thr Glu lie Asp Lys Pro Ser Met Ala Asn Ser Asp Ser Glu Cys 275 280 Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His Asp Gly Val Cys Met 290 295 Tyr ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn Cys Val Val Gly 305 310 Tyr lle Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys Trp Trp Glu 320 325 330 Leu Arg

配列番号:14

配列の長さ:341

配列の型:アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

 Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lie Gly Pro Asp Thr Met Arg

 1
 5
 10
 15

 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser lie Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20
 25
 30

 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35
 40
 45

W 96/17073 PCT/JP95/02/25

Ser	lle	·Ser	Pro	Ser	Asp	λsπ	Ala	Val	lsV	Leu	Thr	λsn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Va l	Val	Ser	Vai	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gin
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	He	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125	٠				130					135
Arg	Vai	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	He	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	He	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165
Glu	Glu	. Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gin	Gin	Ser	Thr	lsV	Ser	Asp
				170					175					180
Vai	Pro	Ara	g Asp	Leu	Clu	Val	Val	Ala	λla	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185	+				190	<b>,</b>				195
Leu	1116	e Se	r Tr	qzk o	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Туг	Tyr	Arg
				200	)				205	<b>,</b>				210
Πe	Th	r Ty	r Gly	y Glu	Thi	Gly	/ Gly	y Asr	Ser	Pro	Va i	Glr	Clu	Phe
				215	;				220	)				225

Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Val	λsp	Tyr	Thr	lle	Thr	Vai	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	lle	Asn	îyr	Arg
				260					265					270
Thr	Glu	lle	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Gly	lle	Tyr	lle	Ser	Gly	llet
				275					280					285
Ala	Pro	Arg	Pro	Ser	Leu	Thr	Lys	Lys	Gln	Arg	Phe	λrg	His	Arg
				290					295					300
Asn	Arg	Lys	Gly	Tyr	Arg	Ser	Gln	Arg	Gly	His	Ser	Arg	Gly	Arg
				305					310					315
Asn	Gln	Asn	Ser	Arg	Arg	Pro	Ser	Arg	Ala	Met	Trp	Leu	Ser	Leu
				320					325					330
Phe	Ser	Ser	Lys	Asn	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	λla				
				335					340					

配列番号:15

配列の長さ:446

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	lle	Gly	Pro	ĄSP	Thr	Het	Arg
1				5					10					15
Vai	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	lle	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	lle	Ser	Pro	Ser	λsp	λsn	Ala	Va l	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65		-			70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Årg	Gin	Lys	Thr	Giy	Leu	Asp
			٠	80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	λsn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Tro	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115		٠			120
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	λrg	Pro	λrg	·Glu	Asp
				125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Va I	Val	Ser	He	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					155
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	ile	Gly	Gln	Gin	Ser	Thr	V a 1	Ser	Asp
				170					175					180

Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	.Va1	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190					195
Leu	lle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Va 1	Thr	Vai	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205					210
l l e	Thr	Tyr	Gly	Giu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Va l	Gin	Glu	Phe
				215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	ile	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Va l	Tyr	Ala	Va I	Thr	Cly	Arg
				245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	λla	Ser	Ser	Lys	Pro	ile	Ser	lle	Asn	Tyr	Arg
				260					265					270
Thr	Glu	lle	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Val	Pro	Gly	Phe	Lys	Gly	Asp
				275					280					285
Met	Gly	Leu	Lys	Gly	λsp	Arg	Gly	Glu	Val	Gly	Gln	He	Gly	Pro
				290					295					300
Arg	Gly	Xxx	λsp	Gly	Pro	Glu	Gly	Pro	Lys	Gly	Arg	Ala	G.1 y	Pro
				305					310					315
Thr	Gly	λsp	Pro	Gly	Pro	Ser	Gly	Gln	Ala	Gly	Glo	Lys	Gʻly	Lys
				320					325					330
Leu	Cly	Val	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Tyr	Pro	Gly	Arg	Gln	G-ly	Pro
				335					340					345
Lys	Gly	Ser	Thr	Gly	Phe	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	λla	Asn	Gly	Giu
				350	ı				355					350

Lys	Gly	Ala	Arg	Gly	Val	Ala	Gly	Lys	Pro	Gly	Pro	Arg	Gly	Gla
				365					370					375
Arg	Gly	Pro	Thr	Gly	Pro	Arg	Gly	Ser	Arg	Gly	Ala	Arg	Gly	Pro
				380					385					390
Thr	Gly	Lys	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Thr	Ser	Gly	Gly	Asp	Gly	Pro
				395					400					405
Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Arg	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro
				410					415					420
Val	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Pro	Pro	Giy	Pro	Pro	Gly	Arg
				425					430					435
Met	Gly	Cys	Pro	Gly	His	Pro	Gly	Gin	Arg	Gly				
				440					445					

配列番号:16

配列の長さ:457

配列の型:アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

 Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lie Gly Pro Asp Thr Met Arg

 1
 5
 10
 15

 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser lie Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20
 25
 30

Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	λsn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	λsn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Va l	Tyr	Glu	Cln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	ile	Asp	Phe	Ser	Asp	He	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Vai	His	Trp	He	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Åsp
				125					130					135
Arg	Vai	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					150
Prò	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	lle	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
				170					175					180
Vai	Pro	λrg	Asp	Leu	Glu	ı Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	ieu
				185					190	l				195
Leu	118	e Se	r Tri	Asp	Ala	Pro	Ala	va l	Thr	Val	Arg	โหก	Tyr	γra
				200	)				205	;				210

ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
				215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	He	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Val	γsb	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Va I	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	λla	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	He	Asn	Tyr	Arg
				260					265					270
Thr	Glu	ile	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Asn	Val	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg
				275					280					285
Ala	Arg	Val	Thr	Asp	Ala	Thr	Glu	Thr	Thr	lle	Thr	.ile	Ser	Trp
				290					295					300
Arg	Thr	Lys	Thr	Glu	Thr	lle	Thr	Giy	Phe	Gln	Vai	λsp	Ala	l s V
				305					310					315
Pro	Ala	Asn	Gly	Gln	Thr	Pro	lle	Gln	Arg	Thr	lle	Lys	Pro	Asp
				320					325					330
Val	λrg	Ser	Tyr	Thr	lle	Thr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly	Thr	Asp	Tyr
				335	İ				340					345
Lys	116	Туа	Lei	ј Туг	Thr	leu	ı Asn	Asp	Asn	Ala	Arg	Ser	·· Ser	Pro
				350	)				355	ı				360
Val	Vai	1 1,10	e Asi	Ala	Sei	Thi	Ala	lle	Asp	Ala	Pro	Sei	r · Asn	Leu
				365	j				370	)				375
Arg	? Ph	e Le	u Ala	a Thi	Thi	r Pro	ızk c	n Ser	Leu	Le	ı Va	l Se	r Tr	Gin
				380	)				385	5				390

Pro Pro Arg Ala Arg lie Thr Gly Tyr lie lie Lys Tyr Glu Lys 395 400 405 Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly 410 415 420 Val Thr Glu Ala Thr lie Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr 425 430 Thr lie Tyr Val lie Ala Leu Lys Asn Asn Gin Lys Ser Giu Pro 445 450 Leu lle Gly Arg Lys Lys Thr 455 配列番号:17 配列の長さ:368 配列の型:アミノ酸 鎖の数:1本鎖 トポロジー:直鎖状 配列の種類:ペプテド 配列: Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn He Gly Pro Asp Thr Met Arg

Pro Thr Asp Leu Arg Pne Thr Ash He Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser He Asp Leu Thr Ash Phe Leu

20 25 30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Ash Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu

35 40 45

WO 96/17073 PCT/JP95/02425

Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Va l	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Vat	Ser	Val	Ser	Ser	Va I	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Giy	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	lle	λsp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Aia	Thr	ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
lle	Arg	, His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130					135
Arg	Va l	l Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Åsn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gl	y Thi	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	ile	Val	Аlа	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165
Gli	ı Gli	u Sei	Pro	ieu	Leu	He	Gly	Gln	Gla	Ser	Thr	۷al	Ser	Asp
				170					175					180
Va!	l Pr	o Arg	g Asp	leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185	1				190					195
Le	ון ט	e Se	Tr	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	λrg	Tyr	Туг	Arg
				200	)				205					210
li	e îh	r Ty	r Gly	Glu	îhr	Gly	Gly	λsn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
				213	<b>,</b>				220	)				225

W 96/17073 PCT/JP95/02/25

Thr	Va i	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Va l	Asp	Tyr	Thr	Пe	Thr	Va i	Tyr	Ala	Va l	Thr	Gly	Årg
				245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	lle	Asn	Tyr	Arg
				260					265					270
Thr	Glu	He	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Ala	lle	Asp	Ala	Pro	Ser	Asn
				275					280					285
Leu	λrg	Phe	Leu	Ala	Thr	Thr	Pro	Asn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Trp
				290					295					300
Gln	Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	lle	Thr	Gly	Tyr	lle	lle	Lys	Tyr	Glu
				305					310					315
Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	λrg	Clu	Val	Val	Pro	Arg	Pro	λŗg	Pro
				320					<b>32</b> 5					330
Gly	Val	Thr	Glu	Ala	Thr	ile	Thr	Gly	Leu	G·l u	Pro	Gly	Thr	Glo
				335	1				340	•				345
Tyr	Thi	ille	. Tyr	Val	lle	Ala	Leu	Lys	Asn	Asn	Gla	·Lys	Ser	Gli
				350	)				355	,				360
Pro	Lei	. 116	e Gly	' Arg	Lys	Lys	Thr							
				365	;									

配列番号:18

配列の長さ:367

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー: 直鎖状 配列の種類:ペプテド

配列:

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	lle	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
i				5					10					15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	lle	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20				•	25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Va l	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	He	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Vai	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	, <b>G</b> 1u	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Årg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85				•	90
Ser	Pro	Thr	Gly	He	Asp	Phe	Ser	λsp	lle	Thr	Ala	λsn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	V a l	His	Trp	He	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	He	Thr	Gly	Tyri	Arg
				110					115					120
ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	G l'y	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130					135
λrg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asa	Ser	l l'e	Thr	Leu	Thr	λsn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	۷al	Val	Ser	lle	Val	Ala	Leu	λsn	Gly	Arg
														165

Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	He	Gly	Gln	Gla	Ser	Thr	Val	Ser	λsρ
				170					175					180
Vai	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190					195
Leu	lle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	λla	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205					210
lle	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
				215					220					225
The	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230	ı				235					240
Pro	Gly	Va!	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245	i				250					255
Gly	Ası	Sei	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	He	Ser	lle	Asn	Tyr	Arg
•		•		260	)				265	i				270
Thr	Gli	ı il	e Ası	Lys	Pro	Ser	Mel	l Asn	Val	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg
				275	5				280	)				285
Ala	a Ar	g Va	l Th	r Ası	Ala	The	Ġli	u Thi	The	116	. The	116	Ser	Trp
				29	0				293	5				300
Ar	g Th	r Ly	s Th	r Gl	u Th	r II	e Th	r Gl	y Pho	e Gli	n Va	l Ası	Ala	val
				30	5				310	)				315
Pr	o Al	z As	n Cl	y Gl	n Th	r Pro	0 []	e Gla	n Àrg	3 Thi	r He	≥ Ly:	. Pro	ezk c
				32	0				325	5				330
Уa	A Ar	g Se	r Ty	r Th	r II	e Th	r Gl	y Le	u Gl	n Pr	o Gl	y Th	r Asi	р Туг
				33	5				34	0				345

WO 96/17073 PCT/JP95/02425

Lys lle Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro 350 355 360

Val Val lle Asp Ala Ser Thr

365

配列番号:19

配列の長さ:464

配列の型:アミノ酸

鎖の数: | 本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lie Gly Pro Asp Thr Met Arg 5 1 10 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu 20 30 25 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu 35 40 Ser lie Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu 55 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln 70 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gin Lys Thr Gly Leu Asp 90 80 -

Ser	Pro	Thr	Gly	lle	λsp	Phe	Ser	λsp	lle	Thr	λla	λsπ	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	λrg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	λsn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Yal	Val	Ser	He	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gin	Gln	Ser	Thr	Va!	Ser	Asp
				170					175					180
Val	Pro	Arg	, Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185	•				190					195
Leu	He	Sei	r Trp	Asp	λla	Pro	Ala	Val	Thr	Val	λrg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205					210
He	The	Ту	r Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Glìn	Glu	
				215					220					225
The	Va	l Pro	o Gly	Sei	r Lys	Ser	The	Ala	Thr	ile	Se I	Gly	Leu	
				230					235					240
Pro	Gli	y Va	l Ass			r 11e	. Thi	r Val			s V a	l Th	Gly	
				243					250					255
G 1	y As	p Se	r Pro			r Se	r Ly:	s Pro			r (1)	e Asi	n Ty	
				26	0				26	5				270

WO 96/17073 PCT/JP95/02/25

Chr	Glu	ile	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Gly	lle	Arg	Gly	Leu	Lys	Gly
				275					280					285
Thr	Lys	Gly	Glu	Lys	Gly	Glu	Asp	Gly	Phe	Pro	Gly	Phe	Lys	Gly
				290					295					300
Asp	Met	Gly	ile	Lys	Gly	Asp	Arg	Gly	Glu	lle	Gly	Pro	Pro	Gly
			٠	305					310					315
Pro	Årg	Gly	Glu	Asp	Gly	Pro	Glu	Gly	Pro	Lys	Gly	Arg	Gly	Gly
				320					325					330
Pro	λsn	Gly	Asp	Pro	Gly	Pro	Leu	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Lys	Gly
				335					340					345
Lys	Leu	Gly	Yal	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Tyr	Pro	Gly	Arg	Gln	Gly
				350					355					360
Pro	Lys	Gly	Ser	lle	Gly	Phe	Pro	Gly	Phe	Pro	Cly	Ala	Asn	Giy
				365					370				¥	375
Glu	Lys	Gly	Gly	Arg	Gly	Thr	Pro	Gly	Lys	Pro	Gly	Pro	Arg	Gly
				380					385					390
Gln	yes	Gly	Pro	Thr	Gly	Pro	Arg	Gly	Glu	Arg	Gly	Pro	Årg	Gly
				395					400					405
lie	Thr	Gly	Lys	Pro	Gly	Pro	Lys	Glγ	λsn	Ser	Gly	Gly	Asp	Giy
				410					415					420
Pro	Ala	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Arg	Gly	Pro	Asn	Gly	Pro	Gin	Glÿ
				425					430					435
Pro	Thr	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	lys	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly
				440					445					450

## Lys Asp Gly Leu Pro Gly His Pro Gly Gln Arg Gly Glu Thr 455 460

配列番号:20

配列の長さ:432

配列の型:アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lie Gly Pro Asp Thr Met Arg 1 10 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu 20 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu 35 40 45 Ser lie Ser Pro Ser Asp Asa Ala Val Val Leu Thr Asa Leu Leu 55 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gin 70 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp 80 85 Ser Pro Thr Gly lle Asp Phe Ser Asp lle Thr Ala Asn Ser Phe 95 100 105

WO 96/17073 PCT/JP95/02/25

Thr	Val	His	Trp	ile	λla	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
	•			110					115					120
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Giy	Årg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	He	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	lle	Val	Ala	Leu	Asn	Cly	Arg
				155					160					165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	ile	Gly	Gin	Gin	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
				170					175					180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	V a l	Va I	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190					195
Leu	lle	Ser	Trp	Asp	λla	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Årg
				200	)			٠	205					210
lle	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
·				215	i				220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	₽eu	Lys
				230	)				235					240
Pro	Gly	/ Va	l Asp	Tyr	Thr	lie	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245	5				250	r				255
Gly	i Ası	S e	r Pro	Ala	a Ser	r Sei	Lys	Pro	lle	Ser	lle	Asn	Tyr	λrg
				260	)				265	<b>i</b>				270
The	r Gli	u II	e yzt	Ly	s Pro	Se Se	r Me	l Ala	. Ala	Gly	Sei	119	The	Thr
				27	5				280	)				285

Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	Asp	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	Phe	Pro	Pro
				290					295					300
Gly	His	Phe	Lys	Asp	Pro	Lys	Arg	Leu	Tyr	Cys	Lys	nzk	Gly	Gly
				305					310					315
Phe	Phe	Leu	Arg	lle	His	Pro	Asp	Gly	Arg	Val	Asp	Gly	Val	Arg
				320					325					330
Glu	Lys	Ser	Asp	Pro	His	lle	Lys	Leu	Cin	Leu	Gin	Ala	Glu	Glu
				335					340					345
Årg	Gly	V a l	Val	Ser	ile	Lys	Gly	Val	Cys	Ala	Asn	Årg	Tyr	Leu
				350					355					360
Ala	Met	Lys	Glu	Asp	Gly	Arg	Leu	Leu	Ala	Ser	Lys	Cys	Val	Thr
				365					370					375
Asp	Glu	Cys	Phe	Phe	Phe	Glu	Arg	Leu	Glu	Ser	Asn	λsn	Tyr	Asn
				380	+				385					390
Thr	Туг	Arg	Ser	Arg	Lys	Tyr	Thr	Ser	Trp	Tyr	Val	Ala	Leu	Lys
				395	•				400	)				405
Arg	? The	r Gly	Gli	туг	Lys	Lei	Gly	Ser	Lys	Thr	Gly	Pro	Gly	Gin
			•	410	)				415	<b>j</b> .				420
Lys	s Ala	a II	e Le	y Phe	e Leu	Pro	Me1	Ser	Ala	Lys	s Ser	•		
				423	5				430	)				

配列番号:21

配列の長さ:574

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	He	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1				5					10					15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Va.l	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	He	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Va I	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Giu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	lle	λsp	Phe	Ser	Asp	He	Thr	Ala	λsn	Sér	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	ile	λla	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
		4		110	)				115					120
ile	Arg	g His	s His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125	<b>)</b>				130					135
λις			o His	Ser	Arg	3 Ası	ı Ser	lle	The	Lev	Thr	. yzu	Leu	The
,	٠,			140	)				145	5	.*			150
Pro	o Gl	y Th	r Glu	Туг	r Va	l Va	l Ser	116	'Va	l Ala	Lei	ı Ası	Gly	Ar
				15	5				16	0				16

Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Y2b
				170					175					180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	۷al	Va!	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
•				185					190					195
Leu	lle	Ser	Trp	Asp	Яlа	Pro	λla	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205					210
lle	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Va!	Gln	Ġlu	Phe
				215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	He	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Val	λsp	Tyr	Thr	lle	Thr	۷a۱	Tyr	λla	Val	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	ile	Asn	Tyr	Arg
				260	1				265					270
Thr	Gly	lle	. Asp	Lys	Pro	Ser	Het	Ala	lle	Pro	Ala	Pro	Thr	Asp
				275	•				280					285
Lei	ı Lys	Phe	Thr	Glo	Yal	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu	Ser	Ala	Gln	Trp
				290	).				295	1				300
The	r Pro	Pro	ızk c			leu	Thr	Gly	Туг	Arg	Val	Arg	Val	
				. 305					310			,		315
Pro	b Ly:	s Gli	u Lys			Pro	Me 1	Lys			. Asn	Leu	Ala	Pro
				320					325					<b>3</b> 30
λs	p Se	r Se	r Se			l Val	l Sei	r Gly			. Val	i Ala	Thr	Lys
				33	5				340	)				345

W 96/17073 PCT/JP95/02425

Гуг	Glu	Val	Ser	Val	Tyr	Ala	Leu	Lys	Asp	Thr	Leu	Thr	Ser	Arg
				350					355					360
Pro	Ala	Gln	Gly	Vai	Val	Thr	Thr	Leu	Glu	Asn	Val	Ser	Pro	Pro
				365					370					375
λrg	λrg	λla	Arg	Val	Thr	λsp	Ala	Thr	Glu	Thr	Thr	lle	Thr	lle
				380					385					390
Ser	Trp	λrg	Thr	Lys	Thr	Glu	Thr	ile	Thr	Gly	Phe	Gla	Val	Asp
				395					400					405
Ala	Val	Pro	Ala	Asn	Gly	Cln	Thr	Pro	lle	Gln	Arg	Thr	lle	Lys
				410					415					420
Pro	Asp	Val	Arg	Ser	Tyr	Thr	lle	Thr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly	Thr
				425					430					435
Asp	Tyr	Lys	lle	Tyr	Leu	.Tyr	Thr	Leu	Asn	Asp	λsn	Ala	λrg	Ser
				440					445					450
Ser	Pro	Val	Val	ile	Asp	λla	Ser	Thr	Ala	lle	γsρ	Ala	Pro	Ser
				455					460					465
Asn	Leu	Arg	Phe	Leu	Ala	Thr	Thr	Pro	Asn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser
				470	1				475					430
Trp	Gln	Pro	Pro			Arg	ile	Thr	Gly	Tyr	He	He	ĽŸS	
				485					490					495
Glu	Lys	Pro	Gly			Pro	Arg	Glu		Val	Pro	Yes	Pro	
				500					503					510
Pro	Gly	y Va	l Thi			Thi	r He	Thr		/ Leu	Glu	Pro	Gly	
				515	5				520	)				525

WO 96/17073 PCT/JP95/02425

## 請求の範囲

- 1. 穿孔法を用いて外来遺伝子を標的細胞に導入し形質転換細胞を製造する方法において、穿孔法を用いて標的細胞内に外来遺伝子の注入操作を行った後、該細胞を細胞接着活性物質の存在下で培養する工程を包含することを特徴とする外来遺伝子による形質転換細胞の製造方法。
- 2. 培養工程が、細胞接着活性物質を被覆した培養器具を用いて培養する工程である請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 3. 細胞接着活性物質が、細胞接着活性ポリペプチドまたは該ポリペプチドの機能的同等物である請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 4. 細胞接着活性ポリペプチドが、細胞接着伸展活性ポリペプチドである請求項3記載の形質転換細胞の製造方法。
- 5. 細胞接着伸展活性ポリペプチドが、配列表の配列番号1で表される アミノ酸配列および/または配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列 を含有するポリペプチドである請求項3記載の形質転換細胞の製造方法。
- 6. 細胞接着活性ポリペプチドが、配列表の配列番号3、4および5で 表されるポリペプチドから選択される請求項3記載の形質転換細胞の製造 方法。
- 7. 細胞接着性物質がポリードーpービニルベンジルーDーラクトンアミドである請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 8. 標的細胞が造血幹細胞、末梢血幹細胞、臍帯血細胞、ES細胞、リンパ球、癌細胞から選択される細胞である請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 9. 外来遺伝子がタンパク質をコードする核酸、ポリペプチドをコード する核酸、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、細胞

内抗体をコードする核酸、偽(デコイ)遺伝子から選択される核酸である 請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。

- 10. 外来遺伝子がタンパク質をコードする核酸、ポリペプチドをコードする核酸、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、細胞内抗体をコードする核酸、偽(デコイ)遺伝子から選択される核酸であり、該核酸がベクターに組み込まれている請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 11. ベクターがレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、 ワクシニアウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクターから選択される ベクターである請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 12. 穿孔法がエレクトロポレーション法、マイクロインジェクション 法およびパーティクルガン法から選択される請求項1記載の形質転換細胞 の製造方法。
- 13. 請求項1記載の形質転換細胞の製造方法によって製造される外来遺伝子による形質転換細胞。
- 14. 請求項1記載の形質転換細胞の製造方法に使用するキットであって、細胞接着活性物質を含有することを特徴とする外来遺伝子による形質 転換細胞の製造用キット。

図 1

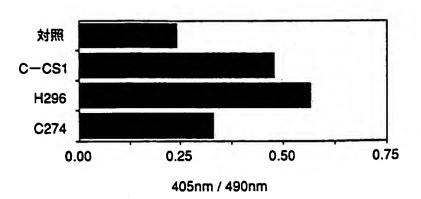
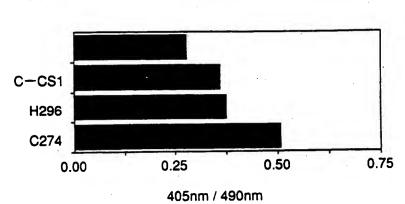


図 2



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP95/02425

Int. C16 C12N15/87, C12N5/10, C07K14/78	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED	
Minimum documentation scarched (classification system followed by classification symbols)  Int. C1 <sup>6</sup> C12N15/87, C12N5/10, C07K14/78	
The CI CIENTS OF CIENTS AND CONTEST OF	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)	
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS CAS ONLINE	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category* Cintion of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A JP, 4-063597, A (W.R. Grace & Co.), February 28, 1992 (28. 02. 92) & EP, 463508, A & CA, 2044307, A	1 - 14
A JP, 6-090771, A (Shiseido Co., Ltd.), April 5, 1994 (05. 04. 94) (Family: none)	1 - 14
	,
)	[
	į į
	•
	1
	ķ
Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.	
<ul> <li>Special categories of cited documents:</li> <li>"I later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the document defining the general state of the art which is not considered</li> </ul>	
to be of perticular relevance: the claimed lavesties cannot be	
"I." document which may throw doubts on priority claim(s) or which is	
cited to establish the particular date of about classes of about the compact of particular relevance; the claimed invention example to specific in reason (as specified)	
Occurrent returning to an other such description of the such description of th	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search  Date of mailing of the international search report	
March 1, 1996 (01. 03. 96) March 19, 1996 (19. 03. 96)	
Name and mailing address of the ISA/ Authorized officer	
Japanese Patent Office	
Facsimile No. Telephone No.	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

- 「L」 優先権主張に設義を機配する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「〇」ロ頭による開示、使用、展示等に含及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日 の後に公表された文献
- 「太」特に関連のある文献であって、当級文献のみで見与の前が 性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって連歩性がないと考えられるもの。
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査報告の発送日 01.03.96 名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 変配参号100 東京都千代田区数が関三丁目4番3号 電話参与03-3581-1101 内線 3449

機式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1992年7月)